

细胞位姿视觉识别的研究

袁玲, 杜启亮

(华南理工大学 自动化科学与工程学院, 广东 广州 510641)

摘要: 由于环境的非结构化, 视觉引导和视觉伺服技术是实现细胞自动注射的重要途径。其中细胞位置和姿态的识别是该技术应用中的重要环节。针对卵细胞浆内精子注射(ICSI)的操作, 提出了一种显微镜下细胞位姿的计算方法。首先根据二值图像的区域几何特征, 检测出细胞区域, 确定细胞的中心位置, 然后依据倒置式光学显微镜的成像特点, 通过图像中细胞膜区域的定向区域灰度特征, 判断细胞的俯仰角是否为零。对俯仰角不为零的情况, 通过 Hough 圆检测识别出细胞膜内轮廓包围的区域中的极体, 最后通过空间几何关系计算出细胞的姿态角。实验结果表明, 该方法能有效地计算出 ICSI 过程中细胞位姿调整阶段中的细胞位置和姿态信息。

关键词: 细胞注射; 位姿识别; 图像

中图分类号: TP242.62

文献标识码: A

文章编号: 1673-629X(2011)12-0089-04

Research on Cell's Position-Orientation Identification

YUAN Ling, DU Qi-liang

(College of Automation Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: Vision-guided and visual servoing are important solutions to automatic cell injection due to the non-structured environment, in which the identification of the position and orientation of a cell acts as a vital part. Present a novel calculating method to work out this problem in an intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) process. The cell's area and centroid were detected by the geometric feature of regions in the binary image, and the elevation was determined whether to be zero by directional gray-level feature in the cell membrane, according to the imaging characteristic of an inverted light microscope. A hough transform for circle detection was carried out in the next step to inspect the polar body in closed region enclosed by the inner contour of the membrane when the elevation was judged non-zero. Attitude angles were calculated according to three-dimensional geometry eventually. An experiment was carried out with detailed description to the results, which proved the effectiveness of the proposed method.

Key words: cell injection; position-orientation identification; image

0 引言

细胞注射是生物技术、基因工程中不可或缺的操作。由于手动的细胞操作容易受操作人员的熟练程度、疲劳情况等因素影响, 所以难以保持稳定的成功率, 同时也成为生物工程产业化的一个瓶颈。近年来, 自动的细胞注射系统逐渐成为国内外的研究热点^[1-4]。

显微注射的细胞一般是用吸附方式固定, 然后注射针从某一特定的位置刺入, 通常要求注射针的方向是固定的, 因此需要调整细胞的姿态来适应。如实行胚胎干细胞注射时, 需要从胚泡壁较厚的方向吸附固定, 从胚泡壁较薄的位置刺入; 某些细胞的注射对注射

点的要求比较严格, 注射区域限制在一个很小的目标范围内, 这就需要调整细胞, 使该目标区域靠近注射针一侧, 以便刺入。目前细胞调整姿态的方法可以分为接触式和非接触式两种, 接触式主要通过微注射针以挑拨的方式进行调整, 非接触式的方式包括吸-放操作、介电泳、电磁法、微流体^[5,6]、激光^[7]或磁场^[8]。无论采用何种细胞位姿调整方式, 在自动细胞注射系统中, 都必须先实现对细胞位姿的检测。由于细胞注射过程是在显微镜下进行的, 是一个非结构化的环境, 目前广泛使用的位置和位姿检测方法都是基于机器视觉的。

自动的位姿调节首先需要实现对细胞当前位姿的识别, 难点主要在于对细胞内部结构图像分析和特征组块的辨别。文中以卵细胞浆内精子注射(ICSI)过程为例, 就如何根据光学显微图像中的细胞图像进行细胞的位姿计算问题展开研究, 讨论了基于二值图像区域特征的细胞定位方法, 提出了一种识别卵细胞极体

收稿日期: 2011-05-04; 修回日期: 2011-08-27

基金项目: 中国博士后基金(20100470909)

作者简介: 袁玲(1972-), 女, 湖南郴州人, 硕士, 工程师, 研究方向为控制理论与控制工程。

并据此计算细胞立体姿态的方法。

1 对象的识别和定位

1.1 彩色图像转化为灰度图像

原图像为彩色图像,因倒置式光学显微镜下成像的特殊性,其色彩信息相对缺乏,对于图像的识别作用不大,为减少图像的大小进而缩短图像处理的时间,文中将彩色图像转换为灰度图像,如式(1)

$$\text{Gray}(i,j) = 0.299R(i,j) + 0.579G(i,j) + 0.114B(i,j) \quad (1)$$

式中: $\text{Gray}(i,j)$ 为转换后的灰度图像在 (i,j) 点处的灰度值; $R(i,j)$ 、 $G(i,j)$ 、 $B(i,j)$ 分别表示转换前的彩色图像在 (i,j) 点处的红、绿、蓝亮度值。

1.2 微吸附针的识别

模板匹配是常用的细胞注射过程中微玻璃针的识别方法^[9]。在细胞的位姿调整阶段,通常将微注射针移出视场,所以仅需识别微吸附针。因基于灰度图像的模板匹配方法往往需要进行平方和乘除运算,而且模板内的每一个像素都要参加运算,相对耗时,故文中采用一种改进的模板识别方法,仅利用图像的边缘信息即可识别出微吸附针。步骤如下:

1) 对如图 1(a) 所示微吸附针的针头部分的灰度模板图像进行提取边缘的计算,得到二值化的图像,边缘处的像素值为 1,其余为 0,如(b)所示;

2) 仅保留外部边缘,内部边缘像素值置为 0,如(c)所示,记值为 1 的像素总数目为 t ;

3) 对目标图像进行提取边缘的计算,得到二值化的图像,边缘处的像素值为 1,其余为 0;

4) 模板图像在目标图像上按从左到右,从上到下的方向,以一个像素为距离作遍历,并与其覆盖的目标图像的区域做掩模运算,然后统计该区域中值为 1 的像素数目,记为 s ;

5) 将 s/t 作为模板在目标图像该位置的匹配值,遍历目标图像后,比值最大的位置即为目标位置。

该模板匹配方法采用二值化的模板,并仅考虑值为 1 的模板像素,设模板中值为 1 的像素数占模板总像素数的比例为 p ,则可以节约计算时间 $1/p$ 倍^[10]。

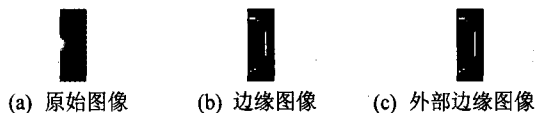


图 1 模板图像

1.3 细胞的识别

识别出微吸附针后,再进行细胞的识别。通常细胞的形状为圆形或近似圆形,所以常用 Hough 变换来识别,但需要给定细胞的直径数值或范围,以缩短运算时间。文中采用基于二值区域的形状特征的方法进行

识别,步骤如下:

1) 采用 Otsu 法自适应地计算分割阈值,并二值化图像,其中前景像素用 1 表示,背景像素用 0 表示;

2) 根据识别出的微吸附针的位置,用背景像素填充其边缘像素,保证二值化图像中微吸附针和细胞膜不会粘连;

3) 去掉面积小于某一阈值 T_{denoise} 的连通区域,这些区域很可能是由于镜头污渍等原因造成的噪声和污染, T_{denoise} 可根据图像特点进行选取;

4) 找出各连通区域的外轮廓,并根据式(2)计算由外轮廓围成的封闭区域的圆度;

$$\text{roundness} = \frac{4\pi A}{C^2} \quad (2)$$

5) 圆度值大于某一阈值 $T_{\text{roundness}}$ 区域的外轮廓为细胞的外轮廓,其包围的区域则为细胞区域, $T_{\text{roundness}}$ 可根据图像特点进行选取。

2 细胞姿态的识别

2.1 二维图像中姿态角的计算方法

在 ICSI 过程中,显微镜下对细胞姿态的识别是依靠对极体的位置来计算的。当找到细胞的位置后,以细胞的质心为原点,水平向右为 x 轴正向,竖直向上为 y 轴正向,垂直于图像平面向上为 z 轴正向,建立局部立体坐标系,如图 2 所示。细胞的姿态用质心到极体的连线的方位角 (azimuth) 和俯仰角 (elevation) 共同表示,如图 3 所示。该两角 Az 和 El 可根据极体的位置坐标 (x_p, y_p) 和细胞的半径 r_c 由式(3)、(4)计算得到。

$$Az = \arccos(x_p / \sqrt{x_p^2 + y_p^2}) + \pi/2 \quad (3)$$

$$El = \arccos(\sqrt{x_p^2 + y_p^2} / r_c) \quad (4)$$

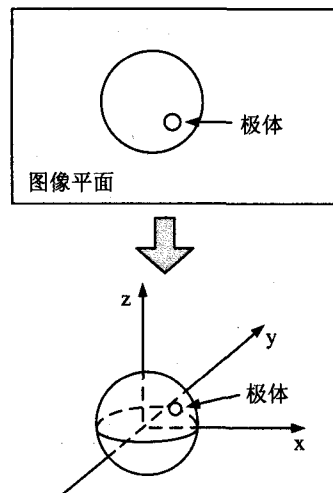


图 2 以细胞中心为坐标原点建立局部立体坐标系

2.2 细胞姿态的计算步骤

显微镜下的细胞膜表现为一个环形的深色区域,当极体与质心近似处于同一水平面上(即俯仰角约等

于0)时,由于倒置式光学显微镜的成像特点,极体表现为深色的细胞膜区域中的一小块浅色区域;当极体与质心不在同一水平面上时,极体表现为细胞膜内部的一个小圆圈,直径和细胞膜的厚度相当。值得一提的是,在后一种情况下,极体在 z 轴上方(俯仰角大于零)和在 z 轴下方(俯仰角小于零)的成像效果是一样的,所以仅根据图像无法分辨,文中假设极体在 z 轴上方,即俯仰角大于零。利用极体在不同位置表现出不同的成像特点,文中设计出一种极体位置检测方法,步骤如下:

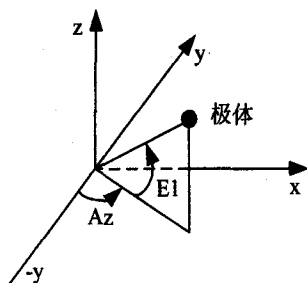


图3 方位角和俯仰角

1) 找出细胞区域后,对二值化图像进行形态学的闭操作,以保证极体部分被完整地分割;

2) 找出细胞膜的外轮廓,从最左边的轮廓像素开始,顺时针依次计算从轮廓点往细胞质心方向的 N 点像素的平均值,形成轮廓邻近像素平均值序列 $S_c = \{s_1, s_2, \dots, s_m\}$,采用4邻域定义, N 取细胞膜的平均厚度, m 为轮廓上像素点的数目;

3) 计算序列 S_c 的平均值 A_s ,检查 S_c 中各点,若各点数值均在 $[A_s - T_s, A_s + T_s]$ 内,则说明此时极体的俯仰角 Az 不为零,转到步骤4;否则,说明此时极体的俯仰角 Az 在零附近的范围内,可以认为 $Az = 0$,其中 T_s 为阈值,可根据图像特点进行选定;

4) 序列 S_c 中的最大值对应的边缘像素可视为极体的位置,可得 (x_p, y_p) ,根据式(4)可计算出方位角 El ,完成;

5) 在细胞膜区域的内轮廓包围的区域中,对灰度图像用Sobel算子进行边缘检测,然后用Hough圆变换,以细胞膜平均厚度的 $\pm 20\%$ 偏差作为直径范围,进行圆检测,得到圆心坐标即为极体位置坐标 (x_p, y_p) ;

6) 根据式(3)、(4)计算俯仰角 Az 和方位角 El ;

7) 完成。

其中第4步用Hough圆变换对边缘图像进行圆检测,Hough变换采用的是一种投票式的机制,所以需指定同属于一个圆的像素点的最小数目 N_{Hough} ,否则,检测的结果可能是没有意义的。设图像中圆周的半径为 r ,若采用中心画圆算法^[11],像素点之间采用欧氏距离计算,在一个八分圆周上,距离为1的像素和距离为

$\sqrt{2}$ 的像素比为 $\frac{\sqrt{2}}{2} : (1 - \frac{\sqrt{2}}{2})$,故圆周上像素点的个数 a 满足

$$\frac{\sqrt{2}}{2}a + (1 - \frac{\sqrt{2}}{2})\sqrt{2}a = 2\pi r \quad (5)$$

$$\text{化简后可得: } a = \frac{2\pi r}{\frac{3\sqrt{2}}{2} - 1} \approx 5.6034r \quad (6)$$

据此,考虑边缘模糊和噪声等因素的影响,文中取 $N_{\text{Hough}} = 3r$ 。

3 实验

运用文中的方法对一段ICSI视频进行实验^[12],该视频中对细胞姿态的调整操作采用反复吸-放的方式,在该操作中,对每一帧图像,实验步骤如图4所示。

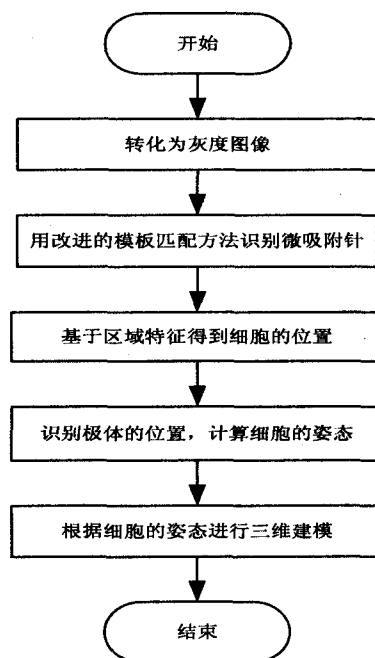


图4 实验流程图

图5(a)、(b)分别是实验中的两幅原始图像,图像分辨率为 320×240 ,从图中极体的位置可知两细胞分别有不同的姿态。(c)、(d)分别是二值化图像,从中可见,细胞的透明带部分没有被包括在细胞区域内,但细胞膜部分已经足以表示细胞位姿的全部信息,细胞的质心位置坐标分别是(131, 141)和(128, 143)。经过去噪声和形态学的闭操作后的图像见(e)、(f),仔细对比(c)和(e)可知,形态学的闭操作可以在极体位于细胞膜区域时确保极体部分被完整分割出来。(g)、(h)分别是沿细胞膜外轮廓往质心方向的 N 点像素平均值序列,其中中间的虚线表示序列的平均值,上下两条虚线表示判断极体的俯仰角是否为零的区间的上下限,可见,(g)有几个像素点的值超出该范围,可认为俯仰角为零,(h)中没有像素点的值超出该范围,

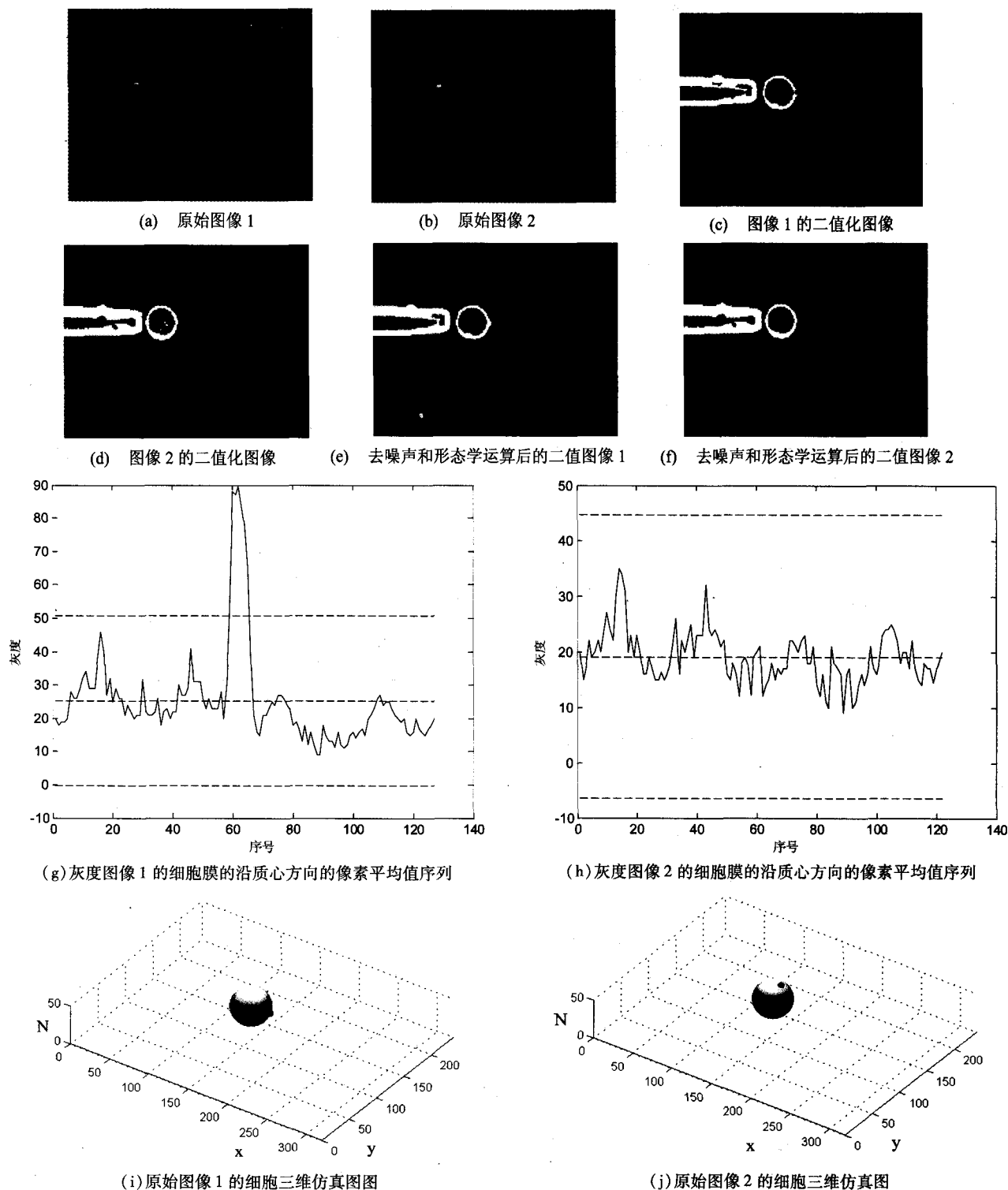


图 5 实验结果

俯仰角不为零。(i)、(j)是三维仿真建模的图像,细胞用球体表示,极体用深色的凸出球形表面表示,并以图像左下角为坐标原点,水平向右为 x 轴正向,竖直向上为 y 轴正向,垂直于图像平面向上为 z 轴正向建立坐标系,将细胞置于其中。经本方法计算出的 (Az, El) 分别为 $(0^\circ, 180^\circ)$ 和 $(64.99^\circ, 102.53^\circ)$ 。对比三维仿真图像和原图像可知,本方法能够比较准确地得到细胞的位姿数据。

4 结束语

文中针对细胞注射过程中基于视觉的细胞位姿的自动识别与计算展开研究,采用图像处理与识别技术,克服显微镜下非结构化环境给细胞位姿检测带来的困难。针对 ICSI 过程,提出一种基于灰度图像特征的细胞位姿的计算方法。实验证明,该方法能够准确地提取出细胞的位置坐标和姿态数据。(下转第 96 页)

(3) FastICA 在算法实现时仅需要设置合适的非线性函数 g 即可,更易实现;

(4) FastICA 在估计源信号时是依次得到独立成分的,因此在遇到只需分离部分源信号的问题时,可以根据需求选择性地分离信号,大大减少计算量。

表 1 不同算法分离后所得信号与源信号之间的相关系数

源信号	S1	S2	S3	S4	S5
ICA	Y2	Y3	Y4	Y1	Y5
ρ_1	-0.9984	0.9958	0.9989	0.9906	-0.9997
梯度算法	Y3	Y2	Y4	Y5	Y1
ρ_2	-0.9705	0.9849	0.9574	0.9865	-0.9684
PCA	Y1	Y3	Y2	Y5	Y4
ρ_3	0.8219	-0.7024	-0.7271	0.8315	0.7859

4 结束语

文中就瞬时混合的线性模型展开讨论,采用 FastICA 算法对观测信号进行盲分离,并将仿真结果与通过梯度算法、PCA 算法仿真的结果进行比较。从仿真结果看, FastICA 是一种比梯度算法、PCA 算法更加有效的算法。然而, FastICA 算法对于瞬时混合的线性模型很实用,但对于非线性模型却并不适用,所以之后的研究工作将主要集中在有关非线性模型的问题上。

参考文献:

- [1] Hyvärinen A, Karhunen J, Oja E. Independent Component Analysis [M]. San Diego: A Wiley - Interscience Publication, 2001.

(上接第 92 页)

参考文献:

- [1] Arai F, Kawaji A, Tomohiko, et al. 3D Micromanipulation System under Microscope [C]//Proceeding of the 1998 International Symposium on Micromechatronics and Human Science. [s. l.]: [s. n.], 1998: 127-133.
- [2] Sun Y, Nelson B J. Biological cell injection using an autonomous microrobotic system [J]. The International Journal of Robotics Research (IJRR), 2002, 21: 861-868.
- [3] 赵 玮, 宗光华, 李旭东, 等. 视觉导引的生物细胞自动操作运动规划的研究 [J]. 高技术通讯, 2001 (8): 93-97.
- [4] 宋彦京, 丁 杰, 杨静宇. 结合水平集方法和 PL 主曲线分析的重叠细胞检测 [J]. 计算机技术与发展, 2010, 20 (5): 199-206.
- [5] Aoyama H, Chiba N, Fuchiaki O, et al. Non-contact bio cell manipulation by nonlinear micro flow around the vibrated pipette on micro robot [C]// Proceedings of ASPE2006 Annual Meeting, Poster Sessions Mechatronics - 1. [s. l.]: [s. n.], 2006.
- [6] 章维一, 侯丽雅, 田桂中. 显微注射用单细胞微操作装置

- [2] Boscolo R. Independent Component Analysis Based on Non-parametric Density Estimation [J]. IEEE Trans, 2004, 15 (1): 55-65.
- [3] 杨竹青, 胡德文. 独立成分分析方法在盲源信号分离中的应用 [J]. 计算机测量与控制, 2002, 10 (3): 200-202.
- [4] Langlois D, Chartier S, Gosselin D. An Introduction to Independent Component Analysis: InfoMax and FastICA Algorithms [J]. Tutorials in Quantitative Methods for Psychology, 2010, 6 (1): 31-38.
- [5] Behera S K. Fast ICA for Blind Source Separation and Its Implementation [D]. [s. l.]: National Institute of Technology, 2009.
- [6] Tichavsky P. Performance Analysis of the FastICA Algorithm and Cramér - Rao Bounds for Linear Independent Component Analysis [J]. IEEE Trans, 2006, 54 (4): 1189-1203.
- [7] 吴微东, 庄哲民. 基于盲源分离的一种快速独立分量分析算法 [J]. 汕头大学学报, 2004, 19 (2): 58-61.
- [8] 李广彪, 张剑云. 基于负熵最大化 FastICA 算法的雷达信号分选 [J]. 舰船电子对抗, 2005, 28 (3): 23-28.
- [9] 曾生根, 朱宁波. 一种改进的快速独立分量分析算法及其在图象分离中的应用 [J]. 中国图象图形学报, 2003, 8 (10): 1159-1165.
- [10] 孙守宇. 盲信号处理基础及其应用 [M]. 北京: 国防工业出版社, 2010.
- [11] 马建仓, 牛奕龙, 陈海龙. 盲信号处理 [M]. 北京: 国防工业出版社, 2006.
- [12] 李文娟, 郭晓静, 吴小培. 结合 ICA 和 PCA 方法的胎儿心电图提取 [J]. 计算机技术与发展, 2007, 17 (8): 223-225.
- [13] 史习智. 盲信号处理 [M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2008.

[P]. 中国: CN200810019091. 8, 2008.

- [7] Fumihito A, Toshiaki E, Ryuji Y, et al. 3D 6DOF Manipulation of Micro-object Using Laser Trapped Microtool [C]//Proceedings of the 2006 IEEE International Conference on Robotics and Automation. [s. l.]: [s. n.], 2006: 1390-1395.
- [8] Floyd S, Pawashe C, Sitti M. Two-Dimensional Contact and Noncontact Micromanipulation in Liquid Using an Untethered Mobile Magnetic Microrobot [J]. IEEE Transactions on Robotics, 2009, 25 (6): 1-11.
- [9] 于保军, 杨志刚. 视觉控制技术在细胞注射装置中的应用 [J]. 长春理工大学学报 (自然科学版), 2007, 30 (4): 58-62.
- [10] Mattos L, Grant E, Thresher R. Speeding up video processing for blastocyst microinjection [C]//Proceedings of the 2006 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems. Beijing, China: Oct, 2006: 5825-5930.
- [11] 孙家广, 杨长贵. 计算机图形学 [M]. 北京: 清华大学出版社, 1995.
- [12] Florida Institute for Reproductive Sciences and Technologies [EB/OL]. 2011-01. http://www.firstivf.net/laboratory_tour.htm.